



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN  
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)  
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ**

(11)



**2-0003999**

(51) A01H 4/00  
2020.01

(13) **Y**

---

(21) 2-2021-00109

(22) 24/03/2021

(45) 25/03/2025 444

(43) 25/05/2021 398A

(71) Sở Khoa học và Công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh (VN)

244 Điện Biên Phủ, phường Võ Thị Sáu, quận 3, thành phố Hồ Chí Minh

(72) Đặng Thị Kim Thúy (VN); Đỗ Đăng Giáp (VN).

---

(54) QUY TRÌNH NHÂN GIỐNG CÂY HỒ TIÊU (PIPER NIGRUM L.) SẠCH BỆNH  
BẰNG PHƯƠNG PHÁP NUÔI CẤY MÔ

(21) 2-2021-00109

(57) Giải pháp hữu ích đề xuất quy trình nhân giống cây hồ tiêu (*Piper nigrum* L.) sạch bệnh bằng phương pháp nuôi cấy mô bao gồm các bước: (i) tạo nguồn mẫu sạch bệnh; (ii) tạo chồi; (iii) nhân cụm chồi; (iv) tăng trưởng chồi; và (v) tạo cây hoàn chỉnh. Cây đạt chiều cao 4 - 5cm và 5 – 6 lá sẽ được chuyển ra vườn ươm.

### **Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập**

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực nuôi cấy mô tế bào thực vật. Cụ thể hơn là đề cập đến quy trình nhân giống cây hồ tiêu sạch bệnh bằng phương pháp nuôi cấy mô.

### **Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích**

Đã biết, cây hồ tiêu (*Piper nigrum* L.) thuộc họ Piperaceae, có nguồn gốc từ Ấn Độ, và chủ yếu được trồng ở các vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới. Hạt tiêu được sử dụng rộng rãi trong nấu ăn và làm nước hoa. Chất lượng của hạt tiêu có thể được đánh giá từ độ cay của nó do thành phần hoạt tính piperin. Ở Việt Nam, điều kiện khí hậu một số vùng ở nước ta rất thích hợp cho việc phát triển cây hồ tiêu. Hồ tiêu được trồng tương đối quy mô ở vùng Hà Tiên vào khoảng thế kỷ XIX và cho đến nay, trồng phổ biến từ Quảng Trị trở vào các tỉnh thuộc Tây Nguyên, Đông Nam Bộ và Tây Nam Bộ (Kiên Giang).

Thông thường, hồ tiêu được nhân giống bằng phương pháp giâm cành. Tuy nhiên, việc sử dụng hom có 2 – 6 mắt đốt để ươm và trồng ngoài đồng có thể chỉ cho năng suất 50 hom/cây/năm, gây hạn chế khả năng nhân giống. Bên cạnh đó, nước ta do có mùa mưa tập trung và có mùa nắng kéo dài nên đây là điều kiện rất thuận lợi cho sâu bệnh phát triển và cũng là nguyên nhân gây giảm năng suất, sản lượng và phẩm chất cho cây tiêu. Các tác nhân gây bệnh tiềm ẩn, đặc biệt là virus, thường làm giảm chất lượng và sản lượng hồ tiêu. Trong những năm gần đây, diện tích trồng hồ tiêu có xu hướng giảm đáng kể do sự tấn công của một số mầm bệnh như mycoplasma, vi khuẩn, virus, nấm và sâu hại. Trong khi đó, các phương pháp nhân giống thông thường như chiết, ghép, giâm cành hoặc trồng bằng hạt cho hệ số nhân giống thấp, giá thành cao, cây giống khi đem trồng dễ mang mầm bệnh gây hại cây tiêu thông qua các thao tác nhân giống.

Đã biết, nuôi cấy mô thực vật là phương pháp hiệu quả và đáng tin cậy để sản xuất hàng loạt cây con không bị nhiễm bệnh, ổn định về mặt di truyền và chất lượng đồng đều. Hiện nay việc nhân giống vô tính cây tiêu bằng phương pháp nuôi cấy mô thực sự cần thiết để tạo ra được số lượng cây giống lớn sạch bệnh cũng như nâng cao năng suất, phẩm chất, sản lượng tiêu, đồng thời hạ giá thành cây giống và làm giảm

thiếu các tác nhân gây hại cho cây giống nhằm mang lại hiệu quả kinh tế cho người nông dân. Đó là lý do tại sao nhân giống bằng phương pháp nuôi cấy mô là một lựa chọn ưu việt và thay thế cho nhân giống truyền thống đối với cây hồ tiêu.

Như đã biết, việc ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào thực vật để nhân giống hồ tiêu bằng phương pháp nuôi cấy mô đã được thực hiện trên tại Việt Nam và trên thế giới:

Trên thế giới

Philip và cộng sự (1992) đã nhân giống cây hồ tiêu bằng đỉnh chồi. Mẫu cây hình thành và phát triển tốt nhất trên môi trường MS có bổ sung 1,5mg/L BAP. Môi trường bổ sung 1,5mg/L BAP kết hợp 3,0mg/L IBA cho hiệu quả nhân chồi tốt nhất và mẫu cấy ra rễ tốt nhất trên môi trường có bổ sung 1mg/L NAA.

Hussain và cộng sự (2011) đã nuôi cấy thân, lá và chồi ngọn của cây hồ tiêu trên môi trường MS có bổ sung 2,4-D, BA, IBA ở các nồng độ khác nhau. Kết quả nghiên cứu cho thấy, mô sẹo được tạo ra tốt nhất trên môi trường MS bổ sung 1,5mg/L BA từ mẫu cây chồi đỉnh, tái sinh chồi tốt nhất trên môi trường MS có bổ sung 0,5mg/L BA và rễ hình thành tốt nhất trên môi trường MS có bổ sung 1,5mg/L IBA.

Umadevi và cộng sự (2015) cũng đã tiến hành nhân giống hồ tiêu thông qua nuôi cấy đỉnh sinh trưởng. Kết quả cho thấy đỉnh sinh trưởng phát triển tốt nhất trên môi trường MS lỏng có chứa 0,1mg/L kinetin và 0,5mg/L GA<sub>3</sub>, cảm ứng tạo chồi trực tiếp trên môi trường ½ MS có bổ sung 3mg/L BA kết hợp 1mg/L IAA. Chồi được hình thành phát triển tốt nhất trên môi trường ½ MS bổ sung 0,5mg/L IBA và cảm ứng tạo rễ hiệu quả trên môi trường WPM có chứa 3mg/L BA và 1mg/L kinetin.

Salim và cộng sự (2017) đã tái sinh chồi hồ tiêu từ mẫu cây đốt thân. Kết quả nghiên cứu cho thấy mẫu cây đáp ứng tốt nhất trên môi trường MS có bổ sung 1,0mg/L BAP và 1,0mg/L IAA. Rễ được hình thành và phát triển tốt trên môi trường MS có chứa 1,5mg/L IBA.

Ở Việt Nam

Đoàn Thị Ái Thuyền và cộng sự (2005) đã nghiên cứu sự tương thích giữa cây hồ tiêu (*P. nigrum* L.) và tiêu gốc ghép (*P. columbrinum* Link.) (do viện Khoa học Kỹ thuật miền Nam cung cấp) bằng phương pháp giải phẫu cấu trúc thân. Giống tiêu gốc

ghép được trồng trong bầu đất tại vườn ươm Viện Sinh học Nhiệt đới. Mẫu khảo sát là cây cao 30-70cm, có từ 10-15 đốt. Những đoạn thân chứa các đốt bánh tẻ được cắt để khử trùng thu nhận mẫu nuôi cấy *in vitro*. Những mẫu không nhiễm được nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 0,5mg/L BA (6 - benzylaminopurin) để tạo chồi. Tạo cụm chồi từ đốt trên môi trường MS có bổ sung BA (0 - 5mg/L) kết hợp 0,5mg/L IBA (axit indol-3-butyric). Các chồi dài 2-3cm được nuôi cấy trên môi trường MS để tạo cây con hoàn chỉnh.

Đỗ Đăng Giáp và cộng sự (2009) đã thực hiện nghiên cứu sự phát sinh hình thái trong nuôi cấy lớp mỏng tế bào (Thin Cell Layer) lá ở cây hồ tiêu (*Piper nigrum* L.). Vật liệu được sử dụng là mảnh lá cây *in vitro* từ cặp lá thứ 2 tính từ ngọn cây xuống, cắt lớp mỏng theo chiều ngang (transverse thin cell layer - tTCL) kích thước 0,5mm x 10mm. Mẫu được cấy lên 2 loại môi trường M1 (MS có bổ sung tổng hợp 0,5mg/L 2,4-D và 5,0mg/L BA), M2 (MS bổ sung 5mg/L BA). Kết quả thu được mẫu cấy tTCL mảnh lá dễ dàng hình thành mô sẹo trên môi trường nuôi cấy.

Thái Xuân Du và cộng sự (2013) đã ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy đỉnh sinh trưởng và lớp mỏng tế bào trong vi nhân giống cây hồ tiêu (*Piper nigrum* L.) giống Vĩnh Linh. Theo đó, sau khi khử trùng chồi cây hồ tiêu giống Vĩnh Linh, đỉnh sinh trưởng được nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng thực vật khác nhau gồm kinetin (N6-furfuryladenin), BA (6-benzylaminopurin), TDZ (thidiazuron) riêng lẻ, sự cảm ứng chồi ban đầu được thúc đẩy hiệu quả nhất trong môi trường MS có bổ sung 0,1mg/L-1 TDZ. Chồi tái sinh từ đỉnh sinh trưởng được nuôi cấy thành cây con hoàn chỉnh. Kiểm tra độ sạch virus gây hại chính trên cây hồ tiêu virus khảm vàng - *Piper yellow mottle virus* (PYMV) trên cây hồ tiêu tái sinh được thực hiện bằng kỹ thuật ELISA. Kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào (Thin Cell Layer - TCL) lá được áp dụng để nhân nhanh *in vitro* cây hồ tiêu. Môi trường MS bổ sung 0,5mg/L 2,4-D và 5,0mg/1 BA trong giai đoạn hình thành mô sẹo từ lớp mỏng tế bào của mảnh lá hồ tiêu kết hợp với môi trường MS bổ sung 5,0mg/L BA ở giai đoạn tái sinh chồi bất định từ mô sẹo cho tỉ lệ tạo mô sẹo, tỉ lệ tái sinh chồi từ mô sẹo và số chồi trung bình/mẫu cấy cao nhất.

Tô Thị Nhã Trâm và cộng sự (2014) đã nghiên cứu khả năng tạo cây từ phôi vô tính và bước đầu áp dụng kỹ thuật giám canh *ex vitro* trong nhân giống cây tiêu (*Piper nigrum* L.). Kết quả thu được cho thấy môi trường MS có bổ sung 0,05mg/L TDZ kết

hợp với 1,0mg/L IBA cho tỉ lệ tạo phôi cao nhất (73,2%) và môi trường MS có bổ sung 3mg/L BA cho tỉ lệ tạo chồi cao nhất (66,7%) từ mô sẹo lá tiêu sau 60 và 28 ngày nuôi cấy, theo thứ tự. Đối với canh giâm từ cây *ex vitro* chế độ tưới nước 6 lần/ngày cho khả năng tạo rễ tốt nhất. Ở giai đoạn vườn ươm, cây tiêu giâm cành được phun sương 3 lần/ngày có tỉ lệ sống và sinh trưởng tốt nhất.

Nguyễn Thị Huyền Trang và cộng sự (2015) đã nghiên cứu sự ảnh hưởng của trạng thái môi trường nuôi cấy và nguồn chiếu sáng đến sự sinh trưởng và phát triển của cây hồ tiêu (*Piper nigrum* L.) giống Vĩnh Linh. Kết quả cho thấy, nguồn chiếu sáng là đèn LED trắng cho chiều cao cây (2,5cm), số rễ (4,5 rễ/cây), chiều dài rễ (1,8cm) và hàm lượng chlorophyll tốt hơn các nguồn chiếu sáng là đèn huỳnh quang và đèn Growlight. Các cây *in vitro* sau đó được đưa ra vườn ươm, cây nuôi cấy dưới đèn LED trắng có khả năng thích nghi tốt hơn với tỷ lệ sống đạt 100%, tỷ lệ ra lá mới 6,3% sau 15 ngày nuôi trồng.

Qua các nghiên cứu đã công bố trước đó của các tác giả trong và ngoài nước, quá trình nhân giống hồ tiêu sử dụng chất điều hòa sinh trưởng thực vật ở nồng độ cao. Điều này có thể gây những biến dị trong quá trình nhân giống và mang lại hiệu quả kinh tế không cao khi sản xuất trên quy mô lớn. Từ thực trạng cây hồ tiêu tại Việt Nam đang nhiễm nhiều loại bệnh hại do virus và vi khuẩn đường như chưa được khống chế. Vì vậy, cần có quy trình nhân giống hồ tiêu sạch bệnh trên quy mô lớn với chi phí sản xuất thấp và giảm giá thành cây giống để cung cấp cho nông dân các vùng trồng hồ tiêu.

### **Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích**

Mục đích của giải pháp hữu ích là nhằm đưa ra một quy trình đầy đủ các bước tạo cây giống hồ tiêu sạch bệnh, cây giống có chất lượng tốt, có thể sản xuất ở quy mô lớn. Để đạt mục đích đó, giải pháp hữu ích đề xuất quy trình nhân giống hồ tiêu sạch bệnh bằng phương pháp nuôi cấy mô. Quy trình này đưa ra cách thức tạo nguồn mẫu sạch bệnh, điều kiện nhân nhanh và tạo cây hoàn chỉnh sử dụng chất cảm ứng ở nồng độ thấp, tránh việc cảm ứng ở nồng độ cao có thể gây ra những biến dị không mong muốn, hệ thống phương pháp và điều kiện thực hiện dễ tiếp cận cho phép thực hiện sản xuất hàng loạt cây giống hồ tiêu sạch bệnh với chi phí sản xuất thấp để từ đó nông dân được tiếp cận cây giống với giá thành tốt và chất lượng được đảm bảo. Cụ thể, quy trình nhân giống hồ tiêu sạch bệnh bằng phương pháp nuôi cấy mô bao gồm các bước sau:

- (i) tạo nguồn mẫu sạch bệnh;
- (ii) tạo chồi;
- (iii) nhân cụm chồi;
- (vi) tăng trưởng chồi; và
- (v) tạo cây hoàn chỉnh.

### Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là ảnh chụp minh hoạ bước (i) tạo nguồn mẫu *in vitro* sạch bệnh theo quy trình của giải pháp hữu ích, trong đó: a) cây mẹ; b) vật liệu nuôi cấy; c) mẫu cây *in vitro* ban đầu và d) mẫu cây *in vitro* sạch bệnh thu được.

Hình 2 là ảnh chụp minh hoạ các bước (ii) đến (iv) của quy trình của giải pháp hữu ích, trong đó: a) chồi bên hình thành; b) cụm chồi hồ tiêu thu được từ bước (ii); c) chồi được nhân nhanh thu được từ bước (iii); và d) chồi tăng trưởng thu được từ bước (iv).

Hình 3 là ảnh chụp minh hoạ bước (v) cây giống hồ tiêu *in vitro*, trong đó: a) tạo rễ *in vitro*; b) hình thái rễ cây hồ tiêu *in vitro*; c) cây giống hồ tiêu *in vitro* và d) cây giống hồ tiêu *in vitro* uơm 2 tháng tuổi.

### Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Dưới đây, quy trình nhân giống cây hồ tiêu sạch bệnh bằng phương pháp nuôi cấy mô theo giải pháp hữu ích sẽ được bộc lộ một cách chi tiết thông qua các phương án thực hiện giải pháp, tuy nhiên cần hiểu rằng các phương án này không nhằm mục đích giới hạn phạm vi của giải pháp hữu ích.

Theo một phương án, giải pháp đề xuất quy trình nhân giống cây hồ tiêu sạch bệnh bằng phương pháp nuôi cấy mô. Cây giống hồ tiêu sạch bệnh được sản xuất thông qua việc nuôi cấy đỉnh sinh trưởng trên môi trường cơ bản MS có bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật. Môi trường MS (Murashige và Skoog, 1962) là môi trường nuôi cấy mô tiêu chuẩn và đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật, bao gồm các thành phần khoáng đa lượng, vi lượng và vitamin đầy đủ đã được sử dụng rộng rãi trong nuôi cấy mô tế bào thực vật. Ví dụ về môi trường nuôi cấy và kỹ thuật nuôi cấy mô chuẩn có thể tìm thấy trong các tài liệu: Murashige T. và Skoog F. (1992), “A revised medium for rapid growth

and bio assays with tobacco tissue culture”, *Physiologia plantarum* 15: 473-497; Nhut D.T., Bui V.L., Nguyen Tri Minh, Jaime T.D.S., Fukai S., Tanaka M. và Tran Thanh Van K. (2002), “Somatic embryogenesis through pseudo-bulblet transverse thin cell layer of *Lilium longiflorum*”, *Plant growth regulation* 37(2): 193-198; Nguyễn Đức Lượng và Lê Thị Thủy Tiên (2006), Công nghệ tế bào; Dương Tấn Nhựt (2009), Công nghệ sinh học thực vật tập 1: Nghiên cứu và ứng dụng, kết hợp với chiếu sáng đèn đơn sắc.

Các chất kích thích sinh trưởng được sử dụng để bổ sung vào môi trường MS trong quy trình của giải pháp hữu ích bao gồm:

- TDZ là thidiazuron
- BA là 6-benzylaminopurin
- IBA là axit indol-3-butyric

Cụ thể, quy trình nhân giống cây hồ tiêu sạch bệnh bằng phương pháp nuôi cấy mô theo giải pháp được thực hiện theo các bước sau:

#### i. Tạo nguồn mẫu sạch bệnh

Các cây mẹ được xử lý nhiệt bằng cách đặt trong buồng nuôi cây có nhiệt độ thay đổi theo ngày với mức chênh lệch tăng thêm 4°C/ngày từ nhiệt độ ban đầu 20°C cho đến 36°C (sau 4 ngày); giữ cây ở nhiệt độ cuối cùng (36°C) trong 4 tuần. Cắt các chồi có chiều dài 5 – 7cm, sau đó rửa sạch và sát trùng tuần tự bằng cồn 70% trong 30 giây; dung dịch javel loãng khoảng 30 – 40 phút; dung dịch khử trùng 0,1% HgCl<sub>2</sub> trong 10 phút; dung dịch chất kháng sinh 0,5% xefotaxin trong 4 giờ. Sau đó, mẫu được cấy vào bình nuôi cấy có chứa môi trường MS có bổ sung 30g/L sucroza và 8g/L aga. Sau 5 - 7 ngày nuôi cấy, những mẫu sống, không bị nhiễm sẽ được tách đỉnh sinh trưởng có kích thước 0,5 – 1,5mm và cấy vào các bình môi trường MS có bổ sung 30g/L sucroza, 8g/L aga và 0,1mg/L TDZ. Mẫu sẽ được cấy chuyển sau 6 tuần nuôi cấy. Các bình mẫu được đặt trong phòng nuôi có cường độ ánh sáng  $50 \pm 2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , nhiệt độ  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  và độ ẩm 60 - 70%, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày.

#### ii. Tạo chồi

Các đốt thân của mẫu cấy có nguồn gốc từ nuôi cấy đỉnh sinh trưởng kết hợp xử lý nhiệt được sử dụng để nuôi cấy. Mẫu được cấy lên môi trường MS có bổ sung 30g/L

sucroza, 8g/L aga và BA với lượng nằm trong khoảng từ 0 – 3mg/L kết hợp với IBA với lượng nằm trong khoảng từ 0 – 0,5mg/L. Mẫu sẽ được cấy chuyển sau 4 tuần nuôi cấy. Các bình mẫu được đặt trong phòng nuôi có cường độ ánh sáng  $50 \pm 2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , nhiệt độ  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  và độ ẩm 60 - 70%, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày; theo một phương án ưu tiên, lượng BA bổ sung là 1,5mg/L và lượng IBA bổ sung là 0,5mg/L.

### iii. Nhân cụm chồi

Các cụm chồi được tách thành các mẫu có từ 1 - 3 chồi nhỏ. Mẫu sau đó được cấy trên môi trường MS có bổ sung 30g/L sucroza, 8g/L aga và BA với lượng nằm trong khoảng từ 0 – 3mg/L kết hợp với IBA với lượng nằm trong khoảng từ 0 – 0,5mg/L. Mẫu sẽ được cấy chuyển sau 4 tuần nuôi cấy. Các bình mẫu được đặt trong phòng nuôi có cường độ ánh sáng  $50 \pm 2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , nhiệt độ  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  và độ ẩm 60 - 70%, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày; theo một phương án ưu tiên, cụm chồi được tách thành các mẫu có 3 chồi nhỏ, lượng BA bổ sung là 1,5mg/L và lượng IBA bổ sung là 0,5mg/L.

### vi. Tăng trưởng chồi

Các chồi đơn được tách riêng và nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 30g/L sucroza, 8g/L aga, 0,5mg/L BA, 0,3mg/L IBA và từ 0,15 đến 0,3g/L axit humic. Mẫu sẽ được cấy chuyển sau 4 tuần nuôi cấy. Các bình mẫu được đặt trong phòng nuôi có cường độ ánh sáng  $50 \pm 2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , nhiệt độ  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  và độ ẩm 60 - 70%, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày.

### v. Tạo cây hoàn chỉnh

Chồi hồ tiêu *in vitro* có chiều cao khoảng  $2 \pm 0,5\text{cm}$  được cấy lên môi trường 1/2MS có bổ sung 30g/L sucroza, 8g/L aga, IBA với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 - 0,3mg/L. Các bình mẫu được đặt trong phòng nuôi có cường độ ánh sáng  $50 \pm 2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , nhiệt độ  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  và độ ẩm 60 - 70%, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày. Sau 6 tuần nuôi cấy, cây đạt chiều cao khoảng 5cm và 5 – 6 lá sẽ được chuyển ra vườn ươm; theo một phương án ưu tiên, lượng IBA bổ sung là 0,3mg/L.

### Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Các ví dụ dưới đây chỉ nhằm minh họa các phương án thực hiện giải pháp hữu ích mà không làm hạn chế phạm vi yêu cầu bảo hộ của giải pháp hữu ích.

Ví dụ 1: Ảnh hưởng của các yếu tố đến quy trình nhân giống cây hồ tiêu sạch bệnh bằng phương pháp nuôi cấy mô

1.1. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng thực vật lên sự hình thành chồi từ nuôi cấy đốt thân cây hồ tiêu *in vitro*

Các đốt thân của mẫu cây có nguồn gốc từ nuôi cấy đỉnh sinh trưởng kết hợp xử lý nhiệt được sử dụng để nuôi cấy. Mẫu được cấy lên môi trường MS có bổ sung 30g/L sucroza, 8g/L aga và BA ở các nồng độ 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 và 3,0mg/L kết hợp với IBA ở các nồng độ 0 và 0,5mg/L.

Bảng 1: Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng thực vật lên sự hình thành cụm chồi từ nuôi cấy đốt thân cây hồ tiêu *in vitro*

| Nồng độ chất điều hòa sinh trưởng thực vật |            | Số chồi hình thành >5mm (chồi/mẫu) | Chiều cao chồi (mm/chồi) | Số lá hình thành (lá/mẫu) |
|--------------------------------------------|------------|------------------------------------|--------------------------|---------------------------|
| IBA (mg/L)                                 | BA (mg/L)  |                                    |                          |                           |
| 0                                          | 0          | 1,10                               | 3,30                     | 0,50                      |
|                                            | 0,5        | 1,00                               | 9,20                     | 1,10                      |
|                                            | 1,0        | 2,00                               | 9,50                     | 1,80                      |
|                                            | 1,5        | 2,20                               | 9,40                     | 2,40                      |
|                                            | 2,0        | 1,70                               | 11,00                    | 1,10                      |
|                                            | 2,5        | 1,30                               | 6,10                     | 1,20                      |
|                                            | 3,0        | 1,70                               | 6,70                     | 1,40                      |
| 0,5                                        | 0          | 1,00                               | 6,00                     | 1,40                      |
|                                            | 0,5        | 1,30                               | 5,10                     | 1,20                      |
|                                            | 1,0        | 1,50                               | 8,20                     | 1,40                      |
|                                            | <b>1,5</b> | <b>2,60</b>                        | <b>7,40</b>              | <b>1,00</b>               |
|                                            | 2,0        | 1,30                               | 4,70                     | 0,50                      |
|                                            | 2,5        | 1,70                               | 8,10                     | 1,20                      |
|                                            | 3,0        | 1,50                               | 3,00                     | 0,50                      |

|       |  |    |    |    |
|-------|--|----|----|----|
| ANOVA |  | ** | ** | ** |
|-------|--|----|----|----|

Trong cùng một nhóm giá trị trung bình, các số có cùng ký tự đi kèm thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê; ns: không khác biệt về mặt thống kê; \*\*: Khác biệt về mặt thống kê ở mức xác suất  $P < 0,01$  trong Tukey's Test

Kết quả ghi nhận sau 4 tuần nuôi cấy ở bảng 1 cho thấy chồi hình thành ở tất cả các nghiệm thức khảo sát. Trong đó, các nghiệm thức bổ sung BA ở khoảng nồng độ từ 1,0mg/L đến 2,0mg/L có hoặc không kết hợp 0,5mg/L IBA cho thấy hiệu quả cảm ứng tốt hơn các nghiệm thức còn lại trong thí nghiệm. Kết quả số chồi hình thành cao nhất sau 4 tuần nuôi cấy ghi nhận được ở nghiệm thức bổ sung 1,5mg/L BA kết hợp 0,5mg/L IBA với số chồi hình thành là 2,60 chồi/mẫu. Nghiệm thức có cùng nồng độ 1,5mg/L BA nhưng không có sự hiện diện của IBA cho số lá hình thành cao nhất là 2,40 lá/mẫu. Cả 2 nghiệm thức này có sự khác biệt về giá trị trung bình nhưng không khác biệt về mặt thống kê ở các chỉ tiêu theo dõi.

Quan sát hình thái mẫu ở thời điểm thu nhận kết quả là 4 tuần nuôi cấy thì thấy rằng ở vị trí đốt các chồi mới hình thành được ghi nhận chỉ là các chồi có chiều cao đạt trên 5mm, bên cạnh đó các mô phân sinh chồi cũng hình thành rất nhiều thành vòng quanh đốt giữa 2 lóng thân. Ghi nhận các lần cấy chuyển tiếp theo, chồi mới sẽ phát sinh ở các vị trí này.

Như vậy, môi trường MS bổ sung 1,5mg/L BA kết hợp IBA trong khoảng nồng độ 0 - 0,5mg/L cảm ứng hiệu quả sự tạo chồi hồ tiêu từ đốt thân.

## 1.2. Ảnh hưởng của trạng thái mẫu cây lên nhân nhanh cụm chồi cây hồ tiêu *in vitro*

Các cụm chồi được tách thành các cụm chồi nhỏ có số lượng chồi khác nhau (1 chồi, 2 chồi và 3 chồi). Mẫu sau đó được cấy trên môi trường MS có bổ sung 30g/L sucroza, 8g/L aga và 1,5mg/L BA kết hợp với 0,5mg/L IBA.

Kết quả ghi nhận sau 4 tuần nuôi cấy ở bảng 2 cho thấy: trong các mẫu chồi khảo sát, mẫu cấy là cụm chứa 3 chồi hồ tiêu phát triển tốt nhất với chồi mới hình thành (chồi có chiều cao  $> 5\text{mm}$ ) là 3,50 chồi/mẫu, chiều cao chồi trung bình 5,85mm/chồi và 1,45 lá hình thành trên mỗi mẫu.

Bảng 2: Ảnh hưởng của trạng thái mẫu cây lên quá trình nhân nhanh cụm chồi từ nuôi cấy đốt thân cây hồ tiêu *in vitro*

| Nghiem thức   | Số chồi mới hình thành >5mm (chồi/mẫu) | Chiều cao chồi (mm/chồi) | Số lá hình thành (lá/mẫu) |
|---------------|----------------------------------------|--------------------------|---------------------------|
| 1 chồi        | 1,10b                                  | 1,50c                    | 0,05b                     |
| 2 chồi        | 2,60a                                  | 4,15b                    | 0,40b                     |
| <b>3 chồi</b> | <b>3,50a</b>                           | <b>5,85a</b>             | <b>1,45a</b>              |
| ANOVA         | **                                     | **                       | **                        |

Trong cùng một nhóm giá trị trung bình, các số có cùng ký tự đi kèm thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. ns: không khác biệt về mặt thống kê; \*\*: Khác biệt về mặt thống kê ở mức xác suất  $P < 0,01$  trong Tukey's Test

1.3. Ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng thực vật lên sự hình thành rễ từ chồi tái sinh cây hồ tiêu *in vitro*.

Chồi hồ tiêu *in vitro* được cấy lên môi trường 1/2MS có bổ sung 30g/L sucroza, 8g/L aga và NAA hoặc IBA riêng lẻ ở các nồng độ 0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 và 0,5mg/L.

Bảng 3: Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng thực vật lên sự hình thành rễ từ chồi tái sinh cây hồ tiêu *in vitro*

| Nghiem thức | Nồng độ chất điều hòa sinh trưởng thực vật (mg/L) | Chiều cao cây (mm/cây) | Số rễ hình thành (rễ/cây) | Số lá hình thành (lá/cây) | Chiều dài rễ (mm/rễ) | Chỉ số SPAD | Diện tích lá (cm <sup>2</sup> /lá) |
|-------------|---------------------------------------------------|------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------|-------------|------------------------------------|
| ĐC          | 0,0                                               | 42,73                  | 3,93e                     | 3,93cd                    | 29,20a               | 12,93       | 3,58                               |
| NAA         | 0,1                                               | 44,60                  | 6,33cd                    | 3,53cdef                  | 18,87d               | 13,26       | 3,41                               |
|             | 0,2                                               | 31,33cd                | 8,53a                     | 3,13ef                    | 12,07de              | 16,28a      | 3,04                               |
|             | 0,3                                               | 38,40                  | 5,60de                    | 3,73de                    | 18,87d               | 8,71        | 3,52                               |
|             | 0,4                                               | 28,60d                 | 7,67                      | 2,80f                     | 11,40e               | 13,47       | 3,00                               |
|             | 0,5                                               | 31,00cd                | 6,80c                     | 3,33def                   | 16,40cde             | 6,63b       | 3,58                               |

|       |            |               |                |             |              |              |             |
|-------|------------|---------------|----------------|-------------|--------------|--------------|-------------|
| IBA   | 0,1        | 43,33         | 4,13de         | 4,67a       | 19,87        | 7,16b        | 2,72        |
|       | 0,2        | 41,73         | 3,73e          | 4,20c       | 20,53        | 8,75         | 2,55        |
|       | <b>0,3</b> | <b>47,93a</b> | <b>4,67cde</b> | <b>4,33</b> | <b>24,87</b> | <b>13,40</b> | <b>4,51</b> |
|       | 0,4        | 38,20         | 3,87e          | 4,13c       | 18,40d       | 10,90        | 3,12        |
|       | 0,5        | 43,33         | 4,00e          | 4,07cd      | 19,87        | 9,73         | 4,10        |
| ANOVA |            | **            | **             | **          | **           | **           | ns          |

Trong cùng một nhóm giá trị trung bình, các số có cùng ký tự đi kèm thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. ns: không khác biệt về mặt thống kê; \*\*: Khác biệt về mặt thống kê ở mức xác suất  $P < 0,01$  Tukey's Test

Kết quả ghi nhận sau 6 tuần nuôi cấy ở bảng 3 cho thấy: môi trường 1/2MS có bổ sung 30g/L sucroza, 8g/L aga, 0,3mg/L IBA cho hiệu quả nuôi cấy tốt nhất với chiều cao cây 47,93 mm/cây; số rễ hình thành 4,67 rễ/cây; số lá hình thành 4,33 lá/cây; chiều dài rễ 24,87 mm/rễ; chỉ số SPAD là 13,40 và diện tích lá là 4,51cm<sup>2</sup>/lá.

Ví dụ 2: Quy trình nhân giống cây hồ tiêu sạch bệnh bằng phương pháp nuôi cấy mô, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

Quy trình sử dụng các thiết bị và dụng cụ thử nghiệm, hóa chất cơ bản phục vụ cho quá trình nhân giống. Chất điều hòa sinh trưởng thực vật dùng cho quy trình này yêu cầu có độ tinh khiết cao (hàm lượng > 95%). Nhìn chung, hóa chất và cơ sở vật chất sử dụng để thực hiện quy trình này đều có thể triển khai, thực hiện với ở quy mô sản xuất lớn phù hợp với điều kiện trong nước.

#### (i) tạo nguồn mẫu sạch bệnh

xử lý nhiệt các cây mẹ bằng cách đặt trong buồng nuôi cấy có nhiệt độ thay đổi theo ngày với mức chênh lệch tăng thêm 4°C/ngày từ nhiệt độ ban đầu 20°C cho đến 36°C (sau 4 ngày); giữ cây mẹ ở nhiệt độ cuối cùng (36°C) trong 4 tuần; cắt các chồi có chiều dài 5 – 7cm, sau đó rửa sạch và sát trùng tuần tự bằng cồn 70% trong 30 giây, dung dịch javel loãng khoảng 30 – 40 phút, dung dịch khử trùng 0,1% HgCl<sub>2</sub> trong 10 phút, dung dịch chất kháng sinh 0,5% xefotaxin trong 4 giờ; sau đó, chồi sau xử lý được cấy vào bình nuôi cấy chứa môi trường MS có bổ sung 30g/L sucroza và 8g/L aga; sau 5 - 7 ngày nuôi cấy, tách đỉnh sinh trưởng có kích thước 0,5 – 1,5mm của những mẫu sống, không bị nhiễm và cấy vào các bình môi trường MS có bổ sung 30g/L sucroza,

8g/L aga và 0,1mg/L TDZ; cấy chuyển mẫu sau 6 tuần nuôi cấy để thu được chồi làm nguồn mẫu sạch bệnh được chứa trong các bình mẫu được đặt trong phòng nuôi có cường độ ánh sáng  $50 \pm 2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , nhiệt độ  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  và độ ẩm 60 - 70%, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày như được minh hoạ trong ảnh d của Hình 1;

(ii) tạo chồi

cấy mẫu thu được từ bước (i) lên môi trường MS có bổ sung 30g/L sucroza, 8g/L aga và 1,5mg/L BA kết hợp với 0,5mg/L IBA, cấy chuyển mẫu sau 4 tuần nuôi cấy để thu được các cụm chồi được chứa trong các bình mẫu được đặt trong phòng nuôi có cường độ ánh sáng  $50 \pm 2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , nhiệt độ  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  và độ ẩm 60 - 70%, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày như được minh hoạ cụ thể trong ảnh b của Hình 2;

(iii) nhân cụm chồi

tách các cụm chồi thu được từ bước (ii) thành các mẫu có 3 chồi nhỏ; sau đó cấy mẫu có 3 chồi nhỏ này trên môi trường MS có bổ sung 30g/L sucroza, 8g/L aga và 1,5mg/L BA kết hợp với 0,5mg/L IBA; cấy chuyển mẫu sau 4 tuần nuôi cấy để thu được các cụm chồi được chứa trong các bình mẫu được đặt trong phòng nuôi có cường độ ánh sáng  $50 \pm 2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , nhiệt độ  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  và độ ẩm 60 - 70%, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày như được minh hoạ cụ thể trong ảnh c của Hình 2;

(iv) tăng trưởng chồi

tách riêng các cụm chồi thu được từ bước (iii) thành các chồi đơn và nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 30g/L sucroza, 8g/L aga, 0,5mg/L BA, 0,3mg/L IBA và từ 0,15 đến 0,3g/L axit humic, cấy chuyển mẫu sau 4 tuần nuôi cấy, đặt các bình mẫu trong phòng nuôi có cường độ ánh sáng  $50 \pm 2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , nhiệt độ  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  và độ ẩm 60 - 70%, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày đến khi các chồi đạt chiều cao khoảng  $2 \pm 0,5\text{cm}$  như được minh hoạ cụ thể trong ảnh d của Hình 2; và

(v) tạo cây hoàn chỉnh được minh hoạ như Hình 3, trong đó:

cấy các chồi hồ tiêu *in vitro* có chiều cao khoảng  $2 \pm 0,5\text{cm}$  thu được từ bước (iv) lên môi trường 1/2MS có bổ sung 30g/L sucroza, 8g/L aga và 0,3mg/L IBA; đặt các bình mẫu trong phòng nuôi có cường độ ánh sáng  $50 \pm 2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , nhiệt độ  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  và độ ẩm 60 - 70%, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày, sau 6 tuần nuôi cấy, cây đạt chiều cao khoảng 5cm và 5 - 6 lá sẽ được chuyển ra vườn ươm.

**Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích**

Như được mô tả chi tiết trên đây, giải pháp này đề xuất quy trình nhân giống hồ tiêu sạch bệnh bằng phương pháp nuôi cấy mô có thể đáp ứng cho việc sản xuất hàng loạt cây giống hồ tiêu sạch bệnh với quy mô lớn, đáp ứng nhu cầu về cây giống tốt cho nông dân phục vụ cho ngành sản xuất hồ tiêu.

## YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình nhân giống cây hồ tiêu (*Piper nigrum* L.) sạch bệnh bằng phương pháp nuôi cấy mô bao gồm các bước:

(i) tạo nguồn mẫu sạch bệnh:

xử lý nhiệt các cây mẹ bằng cách đặt trong buồng nuôi cây có nhiệt độ thay đổi theo ngày với mức chênh lệch tăng thêm 4°C/ngày từ nhiệt độ ban đầu 20°C cho đến 36°C (sau 4 ngày); giữ cây ở nhiệt độ cuối cùng (36°C) trong 4 tuần; cắt các chồi có chiều dài 5 – 7cm, sau đó rửa sạch và sát trùng tuần tự bằng cồn 70% trong 30 giây, dung dịch javel loãng khoảng 30 – 40 phút, dung dịch khử trùng 0,1% HgCl<sub>2</sub> trong 10 phút, dung dịch chất kháng sinh 0,5% xefotaxin trong 4 giờ; sau đó, chồi sau khi xử lý được cấy vào bình nuôi cấy chứa môi trường MS (Murashige và Skoog, 1962) có bổ sung 30g/L sucroza và 8g/L aga; sau 5 - 7 ngày nuôi cấy, tách đỉnh sinh trưởng có kích thước 0,5 – 1,5mm của những mẫu sống, không bị nhiễm và cấy vào các bình môi trường MS có bổ sung 30g/L sucroza, 8g/L aga và 0,1mg/L TDZ (thidiazuron); cấy chuyển mẫu sau 6 tuần nuôi cấy để thu được các chồi làm nguồn mẫu sạch bệnh được chứa các bình mẫu được đặt trong phòng nuôi có cường độ ánh sáng  $50 \pm 2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , nhiệt độ  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  và độ ẩm 60 - 70%, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày;

(ii) tạo chồi:

cấy mẫu thu được từ bước (i) lên môi trường MS có bổ sung 30g/L sucroza, 8g/L aga và 1,5mg/L BA (6-benzylaminopurin) kết hợp với 0,5mg/L IBA (axit indol-3-butyric), cấy chuyển mẫu sau 4 tuần nuôi cấy để thu được các cụm chồi trong các bình mẫu được đặt trong phòng nuôi có cường độ ánh sáng  $50 \pm 2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , nhiệt độ  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  và độ ẩm 60 - 70%, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày;

(iii) nhân cụm chồi:

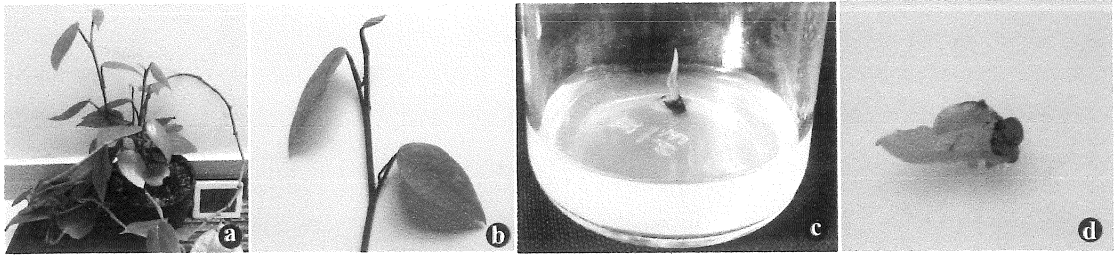
tách các cụm chồi thu được từ bước (ii) thành các mẫu có 3 chồi nhỏ; sau đó cấy mẫu này trên môi trường MS có bổ sung 30g/L sucroza, 8g/L aga và 1,5mg/L BA kết hợp với 0,5mg/L IBA; cấy chuyển mẫu sau 4 tuần nuôi cấy để thu được các cụm chồi được chứa trong các bình mẫu được đặt trong phòng nuôi có cường độ ánh sáng  $50 \pm 2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , nhiệt độ  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  và độ ẩm 60 - 70%, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày;

(iv) tăng trưởng chồi

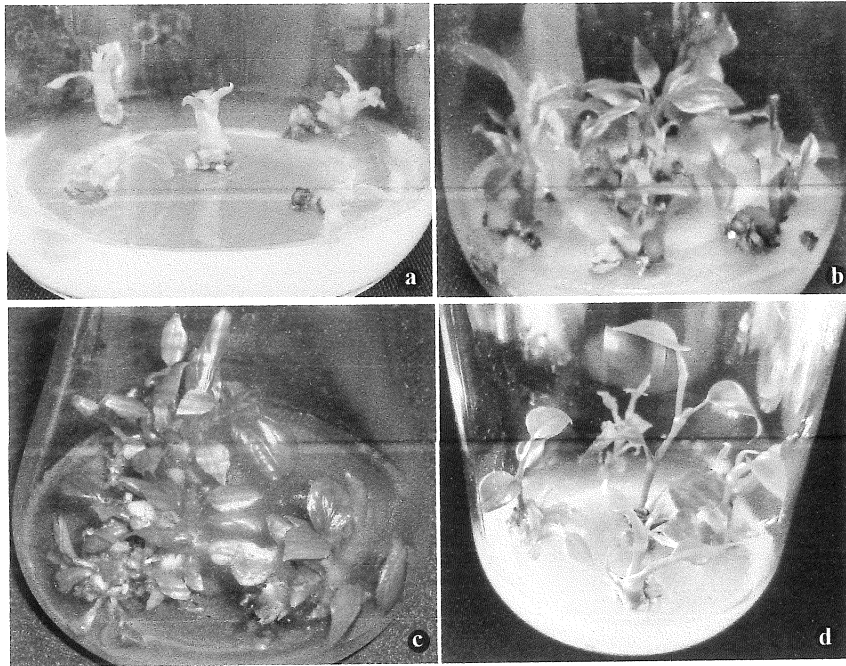
tách riêng các chồi đơn từ cụm chồi ở bước (iv) và nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 30g/L sucroza, 8g/L aga, 0,5mg/L BA, 0,3mg/L IBA và từ 0,15 đến 0,3g/L axit humic, cấy chuyển mẫu sau 4 tuần nuôi cấy để thu được các chồi có chiều cao khoảng  $2 \pm 0,5$ cm được đựng trong các bình mẫu được đặt trong phòng nuôi có cường độ ánh sáng  $50 \pm 2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , nhiệt độ  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  và độ ẩm 60 - 70%, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày; và

(v) tạo cây hoàn chỉnh

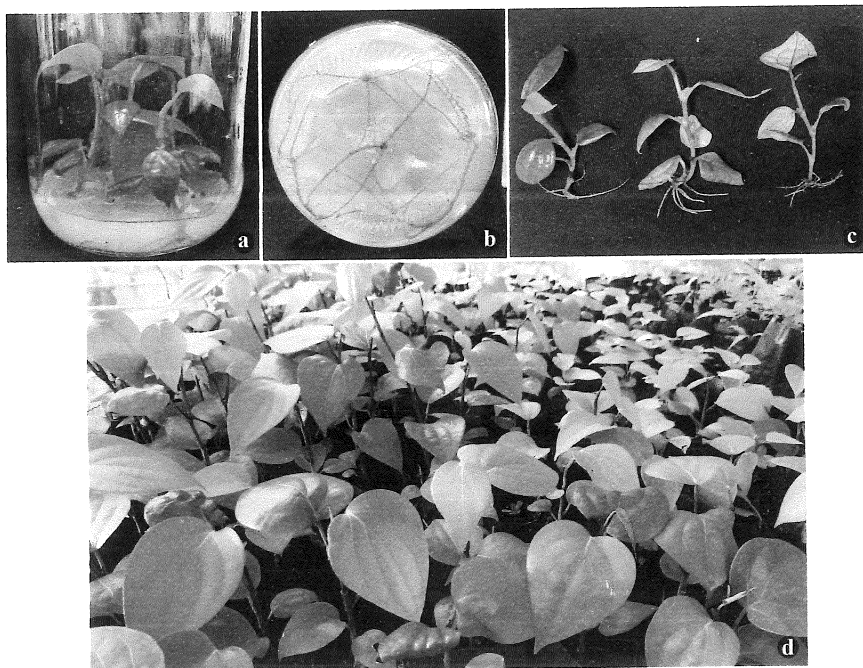
cấy các chồi có chiều cao khoảng  $2 \pm 0,5$ cm thu được từ bước (iv) lên môi trường 1/2MS có bổ sung 30g/L sucroza, 8g/L aga và 0,3mg/L IBA; đặt các bình mẫu trong phòng nuôi có cường độ ánh sáng  $50 \pm 2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , nhiệt độ  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  và độ ẩm 60 - 70%, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày, sau 6 tuần nuôi cấy, cây đạt chiều cao khoảng 5cm và 5 – 6 lá sẽ được chuyển ra vườn ươm.



Hình 1



Hình 2



Hình 3